Aus dem Institut für Physiologische Chemie

der

Abteilung für Naturwissenschaftliche Medizin

der

Ruhr-Universität Bochum

Mg^{2+} ALS MEDIATOR DER INFORMATIONSÜBERTRAGUNG BEIM REGULATIONSSYSTEM DER MUSKELKONTRAKTION

D I S S E R T A T I O N

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der

Medizin

der

Abteilung für Naturwissenschaftliche Medizin

der

Ruhr-Universität Bochum

von

Dr. rer. nat. JAKOB ELIESER SPERLING

aus München

1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547222_0017

Aus dem Institut für Physiologische Chemie

der

Abteilung für Naturwissenschaftliche Medizin

der

Ruhr-Universität Bochum

Mg^{2+} ALS MEDIATOR DER INFORMATIONSÜBERTRAGUNG BEIM REGULATIONSSYSTEM DER MUSKELKONTRAKTION

D I S S E R T A T I O N

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der

Medizin

der

Abteilung für Naturwissenschaftliche Medizin

der

Ruhr-Universität Bochum

von

Dr. rer. nat. JAKOB ELIESER SPERLING

aus München

1982

Referent: Prof. Dr. L.M.G. Heilmeyer, jr.

Korreferent: Prof. Dr. A. W. Holldorf

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juli 1982

UNIV.
LEIDEN
BRL.

Hannale,

meinem geliebten Flini

Für ihren Anteil an der Entstehung dieser Arbeit
danke ich besonders

Herrn Prof. Dr. L.M.G. Heilmeyer, jr. für die
Überlassung des Themas, die Bereitstellung der
Arbeitsmöglichkeiten und sein stetes Interesse,

Frau Dr. U. Jahnke für die Anleitung der Computer-
Programme,

Herrn H. Korte für seine exzellente technische
Assistenz.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1.	EINLEITUNG	1
2.	METHODIK	5
2.1.	Präparative Methoden	5
2.1.1.	Troponin-Präparation	5
2.1.2.	Herstellung von Caseinsepharose	5
2.1.3.	Herstellung von dephospho-Troponin	6
2.1.4.	Herstellung von ATP-γ-^{32}P	6
2.1.5.	Präparation von katalytischer Untereinheit der c-AMP-abhängigen Proteinkinase	7
2.1.6.	Herstellung von Ca^{2+}-EGTA-Puffern	7
2.1.7.	Phosphorylierung von Troponin mit der katalytischen Untereinheit der c-AMP-abhängigen Proteinkinase	8
2.2.	Analytische Methoden	9
2.2.1.	SDS-Gelelektrophorese	9
2.2.2.	Proteinbestimmung	10
2.2.3.	Bestimmung des Proteingebundenen Phosphates	10
2.2.4.	Analyse proteolytischer Aktivitäten in den Troponinpräparationen	11
2.2.5.	Bestimmung der Einbauaktivität von katalytischer Einheit der c-AMP-abhängigen Proteinkinase am Troponin	11
2.2.6.	Berechnung der Liganden Ca^{2+} und Mg^{2+} an Troponin	12

3.	ERGEBNISSE	13
3.1.	Abtrennung der proteolytischen Aktivitäten vom Rohtroponin durch Aussalzchromatographie auf Caseinsepharose	13
3.2.	Phosphatgehalt der Troponinkomplexe	13
3.3	Kinetik des Phosphateinbaus in die TNI-Untereinheit mit katalytischer Einheit c-AMP-abhängiger Proteinkinase des Holotroponins und Holodephosphotroponins	16
3.3.1	Mg^{2+}-Abhängigkeit der Phosphorylierung bei vorgegebener Ca^{2+}-Konzentration	16
3.3.2	Ca^{2+}-Abhängigkeit der Phosphorylierung bei vorgegebener Mg^{2+}-Konzentration	22
3.3.3.	Aktivität der Phosphorylierung an der TNI-Einheit des Holotroponins in Abhängigkeit von den Besetzungszuständen der TNC-Einheit mit Ca^{2+} und Mg^{2+}	30
4.	DISKUSSION	30
5.	ZUSAMMENFASSUNG	40
6.	LITERATURVERZEICHNIS	41

Abkürzungen

Neben den Abkürzungen der IUPAC-IUB Kommission für biochemische Nomenklatur im Handbook of Biochemistry 2 nd Edition wurden folgende Abkürzungen benutzt:

c-AMP	3'5'-cyclisches Adenosinmonophosphat
ANSA	1-Amino-2-hydroxynaphtalinsulfonsäure-(4)
EGTA	Äthylenglycol-bis(ß-Aminoäthyläther)-N,N'-tetraessigsäure
GP	Natrium-ß-glycerophosphat
H	Hill-Koeffizient
ME	ß-Mercaptoäthanol
r	Bindungsrate
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure

1. EINLEITUNG

Die kontraktile Einheit des Muskels, das Sarkomer (Huxley, 1972), ist aus dem dicken und dünnen Filament aufgebaut (Huxley, 1957), die sich bei der Kontraktion teleskopartig ineinander schieben. Das dicke Filament enthält hauptsächlich Myosin (Szent-Györgyi et al., 1955) mit einem Molekulargewicht von 475 000 (Lowey et al., 1969), das dünne Filament zum größten Teil Aktin (Hanson und Lowy, 1963) mit einem Molekulargewicht von 42 000 (Elzinga et al., 1973). Auf je sieben Aktinmoleküle kommt ein Molekül Tropomyosin und Troponin (Ebashi et al., 1968). Das Tropomyosin ist ein langgestrecktes Molekül mit einem Molekulargewicht von 70 000 (Ebashi et al., 1968).

Troponin ist das eigentliche Steuerungsprotein der Muskelkontraktion (Schaub und Perry, 1969) mit einem Molekulargewicht von 90 200 (Sperling et al., 1979; Sperling et al., 1980). Es besteht aus drei verschiedenen Untereinheiten (Ebashi et al., 1971); der Tropomyosin bindenden Einheit TNT (Greaser und Gergely, 1971) mit einem Molekulargewicht von 30 500 (Pearlstone et al., 1977), der die Aktomyosin-ATPase hemmenden Einheit TNI (Perry et al., 1972) mit einem Molekulargewicht von 20 900 (Wilkinson und Grand, 1975), von der im Holotroponinkomplex zwei vorhanden sind (Sperling et al., 1979; Sperling et al., 1980, und der Ca^{2+}

und Mg^{2+} bindenden Einheit TNC (Hartshorne und Pyun,1971; McCubbin et al.,1974) mit einem Molekulargewicht von 17 900 (Collins et al.,1977).

Die aus Aktin und Myosin gebildeten Aktomyosin-ATPase setzt durch Hydrolyse von ATP die für die Kontraktion nötige Energie frei (Szent-Györgyi,1951). Die Ca^{2+}- Sensitivität dieser ATPase wird durch das Troponin über das Tropomyosin dem Aktomyosin vermittelt (Schaub und Perry,1969). Dabei wird die Aktomyosin-ATPase durch das TNI gehemmt. Diese Hemmung wird wieder durch TNC (bei einer Ca^{2+}- Konzentration von 10^{-5} M) aufgehoben.

Das TNC besitzt 6 Metallbindungsseiten, von denen je zwei spezifisch für Ca^{2+}, zwei spezifisch für Mg^{2+} und zwei sowohl für Ca^{2+} als auch für Mg^{2+} spezifisch sind (Potter und Gergely,1975; Jahnke und Heilmeyer,1980).
Das TNT enthält ein Mol Phosphat, das am N-terminalen Serin-1 gebunden ist (Pearlstone et al.,1977). Dieses Phosphat kann mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm wieder abgespalten werden (Sperling und Heilmeyer,1980). Zusätzlich kann am TNT des Gesamtkomplexes noch ein Mol Phosphat eingebaut werden (Sperling et al.,1978; Sperling et al.,1979).
Mit c-AMP-abhängiger Proteinkinase kann, wie Bailey und Villar-Palasi (1971) erstmals zeigten, die TNI-Einheit

phosphoryliert werden. Dieser Phosphateinbau geschieht auch am Holokomplex streng spezifisch in das TNI. Der Einbau wird dabei von TNC reguliert. Diese Regulation wird wiederum durch TNT modifiziert (Sperling et al., 1979).

Schon früher wurde versucht, die biologische Funktion des endogenen Phosphates des Kaninchenskelettmuskeltroponins zu bestimmen (Lallemant et al., 1975). Jedoch wurde das eingesetzte Troponin sehr wahrscheinlich durch in den von ihnen benutzten Troponinpräparationen vorhandenen proteolytischen Aktivitäten angedaut (Sperling et al., 1979), so daß der Serin-Phosphat tragende Teil des TNT für die Rekonstitution nicht mehr zur Verfügung stand.

Da es von Anfang an Ziel dieser Arbeit war, die biologische Funktion des N-terminalen Serin-1-Phosphates am TNT zu erforschen, war es notwendig, ein gut reproduzierbares Verfahren zu entwickeln, um die in den Troponinpräparationen vorhandenen proteolytischen Aktivitäten zu entfernen; dies gelang durch Aussalzchromatographie an Caseinsepharose. Dadurch konnten wir Holotroponine mit genau definiertem Phosphatgehalt am Serin-1 der TNT-Einheit darstellen, bei denen wir sicher waren, daß es bei den nachfolgenden Experimenten nicht zu unspezifischen Phosphorylierungen am Troponin kam, welches bei der vorangehenden Dephosphorylierung oder der Phosphorylierung im experimentellen Ansatz bei vorhandener

proteolytischer Aktivität angedaut wurde.
Als Indikatorsystem der biologischen Funktion des Serin-1-Phosphates am TNT wurde die Phosphorylierbarkeit der TNI-Einheit am gleichen Holotroponinmolekül gewählt.
Dies war deshalb sinnvoll, da die Phosphorylierung der TNI-Einheit mitc-AMP-abhängiger Proteinkinase streng spezifisch ist, die Zugänglichkeit zur Phosphorylierbarkeit der TNI-Einheit von der Ca^{2+} und Mg^{2+} Bindung an der TNC-Einheit abhängt, welche wiederum durch die TNT-Einheit beeinflusst wird (Sperling et al., 1979; Jahnke und Heilmeyer, 1980).

Dadurch gelang es in dieser Arbeit einen möglichen Aspekt der biologischen Funktion des Phosphates am Serin-1 der TNT-Einheit, welches wir in unseren Präparationen zwar immer in phosphorylierter Form fanden von dem wir aber nicht wissen in welcher Form es im lebendigen Muskel vorhanden ist, aufzuzeigen.
Weiter konnte gezeigt werden in welcher Weise die Phosphorylierung der TNI-Einheit von der Besetzung der Ca^{2+}/Mg^{2+} kompetitiven Bindungsseiten der TNC-Einheit mit Ca^{2+} und Mg^{2+} abhängt.

2. METHODIK

2.1. Präparative Methoden

2.1.1. Troponin-Präparation

Das nach der Methode von Ebashi et al. (1971) gewonnene Troponin wurde wie folgt von proteolytischen Aktivitäten gereinigt.

Das auf 20 mg/ml angereicherte Rohtroponin wurde auf 0,4 M LiCl; 30 % Ammoniumsulfatsättigung eingestellt und anschließend auf eine 5 x 25 cm Casein-Sepharose Säule, die gegen den gleichen Puffer äquilibriert war präzisorbiert. Es wurde mit dem 1,5-fachen Säulenvolumen des Aufgabepuffers gewaschen. Anschließend wurde das Troponin mit einem linearen Ammoniumsulfatgradient von 30 % nach 0 % Sättigung des 8-fachen Säulenvolumen eluiert. Die Ausbeute des bei etwa 24 %-Ammoniumsulfatsättigung eluierten Troponins betrug etwa 0,5 g/kg Kaninchenskelettmuskel.

2.1.2. Herstellung von Casein-Sepharose

100 g trockengesaugte Sepharose 4B wurde 4 mal mit 400 ml eisgekühlten destilliertem Wasser gewaschen und anschließend in 400 ml eisgekühlten destilliertem Wasser suspendiert. Die Suspension wurde mit 2N NaOH auf pH 11 gebracht und mit 10 g festem BrCN versetzt. Unter starkem Rühren wurde

der pH mit einem Autotitrator für 15 min konstant gehalten. Die Temperatur wurde durch Zugabe von Eisstückchen auf maximal 10° gehalten. Diese Reaktion wurde durch Waschen mit 2l kaltem Wasser über einen Büchnertrichter gestoppt. Die so aktivierte Sepharose wurde mit 600 mg Casein in 150 ml 0,1 M $NaHCO_3$ pH 7,5 versetzt und eine Stunde bei 4° gerührt. Die so erhaltene Casein-Sepharose wurde mit 0,1 N NaOH, dann mit 1 M NaCl und zuletzt mit Wasser gewaschen.

2.1.3. Herstellung von dephospho-Troponin

500 mg Troponin in etwa 30 ml 1 mM $NaHCO_3$ wurde mit 3 ml 1 M Glycin pH 10,5; 10 mM $MgCl_2$; 1 mM $ZnCl_2$ und 100/ul alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (10 mg/ml Boehringer Mannheim EC 3.13.1) versetzt und 2 Stunden bei 30° inkubiert. Nach erfolgter Reaktion wurde die Phosphatase über eine Sephacryl S300-Säule (2,5 x 90 cm; 130 ml/min) in Gegenwart von 0,5 M KCl; 10 mM Tris pH 7,5 wieder abgetrennt.

2.1.4. Herstellung von ATP- γ -^{32}P

ATP- γ - ^{32}P wurde nach der von Glynn und Chappel (1964) angegebenen Methode dargestellt, in Wasser aufgenommen und im Tiefkühlschrank bei -20° aufbewahrt.

2.1.5. Präparation von katalytischer Untereinheit der c-AMP-abhängigen Proteinkinase

Die katalytische Untereinheit der c-AMP-abhängigen Proteinkinase wurde nach der von Beavo et al. (1974) angegebenen Methode aus Kaninchenskelettmuskulatur gewonnen, auf 55 % Glycerin dialysiert und im Tiefkühlschrank bei -20° aufbewahrt.

2.1.6. Herstellung von Ca^{2+}-EGTA-Puffern

Alle Arbeitsgänge wurden in Plastikgefäßen durchgeführt, die zunächst mit EGTA und dann mit zweifach quarzdestilliertem Wasser, das durch einen Millipore-Filter weiter gereinigt war, gespült worden sind. Als Grundsubstanzen wurden, soweit erhältlich, Suprapur-Reagenzien verwendet. Zur Einstellung wurde 0,5 mM EGTA vorgelegt und mit der entsprechenden Menge Ca^{2+}-Tritrisol titriert, die wie folgt berechnet wurde.

Die Berechnung erfolgte nach dem Programm MATRIX von Perrin und Sayce (1967). Das Programm dient der Berechnung der Konzentrationen der freien Metallionen und Komplexbildner und ihrer verschiedenen Komplexe einschließlich der protonierten Spezies bei Lösungen, die verschiedene Metallionen und Komplexoren nebeneinander enthalten. Als Daten werden die Gesamtkonzentrationen der Metalle und Komplexoren, der pH, die Zahl und Zusammensetzung der Komplexe

und ihre Assoziationskonstanten. Die Konstanten wurden dem Tabellenwerk von Sillen und Martell (1971) entnommen.
Der Text des Programmes und die in dieser Arbeit verwendeten Assoziationskonstanten sind im Anhang wiedergegeben.

2.1.7. Phosphorylierung von Troponin mit der katalytischen Untereinheit der c-AMP-abhängigen Proteinkinase

Folgender Ansatz wurde bei 30^{o} inkubiert; 450 ug/ml des zu phosphorylierenden Proteins (Holotroponin; Dephosphotroponin); 50 mM GP-HCl pH 6,9; 15 mM ME; 0 bis 15 mM $Mg(CH_3COO)_2$; 1 mM EGTA-Ca^{2+}-Puffer; 3 ug/ml katalytische Einheit c-AMP-abhängiger Proteinkinase; 0,35 mM ATP-γ -^{32}P 10 bis 20 Ci/Mol.
Bei den kinetischen Messungen wurden jeweils 200 ul inkubiert und zu den gewünschten Zeiten jeweils Proben von 20 ul gezogen.

2.2. Analytische Methoden

2.2.1. SDS-Gelelektrophorese nach Weber und Osborn (1969)

Stammlösungen:

I. 22,2 g Acrylamid und 0,6 g Methylen-bis-Acrylamid werden mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

II. 60 mg Ammoniumperoxidisulfat in 4 ml Wasser gelöst.

III. 28,5 ml 1 M NaH_2PO_4; 145 ml 0,5 M Na_2HPO_4 und 10 ml 10 % SDS werden mit Wasser auf 500 ml aufgefüllt.

Für 10 %-ige Gele wurde wie folgt zusammengegossen:
9 ml I. 10 ml III. und 20 µl Tetramethyläthylendiamin, das Gemisch wurde entgast und die Polymerisationsreaktion durch Zugabe von Lösung II gestartet. Das Reaktionsgemisch wird sofort in Glasröhrchen gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach einer Stunde sind die Gele gebrauchsfertig.

Die Elektrophoresekammern werden mit Kammerpuffer (Lösung III 1 : 1 verdünnt) gefüllt und das Protein nach Denaturierung für 5 min bei 100° in 1 % SDS; 0,01 M Na_2HPO_4; 1 % ME; 10 % Glycerin und 0,002 % Bromphenolblau kathodisch auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese dauert bei einer Markerlaufstrecke von 6 cm und einer Spannung von 80 Volt etwa 150 min.

Gefärbt wurde mit 625 mg Coomassie-Brilliant-Blau R-250 in 227 ml 50 % Methanol; 23 ml Essigsäure für 20 min bei 70°. Entfärbt in 7,5 % Essigsäure; 5 % Methanol bei 70°.

2.2.2. Proteinbestimmung modifiziert nach Lowry (1951)

Das Protein wurde mit 1 ml 10 %-iger TCA bei 0^{o} gefällt, sedimentiert und in 500 µl 1 % SDS; 0,1 N NaOH gelöst. 200 µl Probe wurden im Technicon-Auto-Analyser bei Raumtemperatur mit dem gleichen Volumen 0,1 % $CuSO_4$ x 5 H_2O; 0,24 % Dinatriumtartrat x 2 H_2O pH 7,0 versetzt. Nach 1 min wurde 0,85 ml 0,2 N NaOH; 2 % Na_2CO_3 zugegeben, nach einer weiteren min 0,5 ml Folin-Ciocalteau-Reagenz (Merck, 1 : 4 mit Wasser verdünnt) und 5 min inkubiert. Es wurde bei 660 nm photometriert. Die Eichung erfolgte mit Rinderserumalbumin-Standardlösungen. Die Ermittlung des Korrekturfaktors für Troponin erfolgte nach Sperling et al. (1979) und betrug 1,1.

2.2.3. Bestimmung des proteingebundenen Phosphates nach Bartlett (1959)

Das Protein wurde 3 mal mit gleichem Volumen 10 % TCA gefällt, sedimentiert und in 100 % Ameisensäure aufgenommen. Der Proteingehalt wurde bestimmt und pro Analyse wurden etwa 5 mg Protein mit 0,2 ml 10 n H_2SO_4 versetzt und bei 160^{o} 8 Stunden verkohlt. Um die entstandene Kohle zu CO_2 zu oxidieren, wurde mit 0,5 - 1,5 ml 30 % H_2O_2 bei 160^{o} 16 Stunden abgeraucht. Die Proben wurden mit Wasser auf 1 ml aufgefüllt, mit 0,4 ml 2,5 % Ammoniummolybdat; 3,4 ml Wasser und 0,2 ml ANSA 7 min bei 100^{o} inkubiert. Die Extinktion wurde bei 660 nm bestimmt..

2.2.4. Analyse proteolytischer Aktivitäten in den Troponin-präparationen

150 /ug Troponin wurden in 0,5 ml 50 mM Tris; 15 mM ME; 4 mM Magnesiumacetat pH 7,5 mit 0,2 mM EGTA und ohne EGTA bei 30° 2 Stunden inkubiert. Dann wurden je 50 /ul für SDS-Gele entnommen (2.2.1.). Durch densitometrische Auswertung wurde auf Ab- oder Anwesenheit von proteolytischer Aktivität geschlossen.

2.2.5. Bestimmung der Einbauaktivität von katalytischer Einheit der c-AMP-abhängigen Proteinkinase am Troponin

Aus dem unter 2.1.7. beschriebenen Ansatz wurden zu den gewünschten Zeiten Proben zu 20 /ul entnommen und auf Glasfiber-Papier-Plättchen (Whatman GF/C, Ø 2,5 cm) pipettiert. Die Plättchen werden sofort in eine 10 % TCA; 1 % $Na_4P_2O_7$; 1 % K_2HPO_4-Lösung gegeben. Man läßt die Plättchen 30 min in dieser Lösung, gibt sie 5 min in eine frische Lösung gleicher Zusammensetzung, zweimal 5 min in 10 % TCA, jeweils 5 min in Wasser, Aceton und Äther. Man läßt die Plättchen 15 min bei 50° trocknen und überführt sie in Szintillationsgefäße, wo sie mit je 5 ml Szintillatorlösung versetzt (21,84 g Diphenyloxazol; 2,16 g 1,4-Di-(2-Methylstyryl-)-Benzol; 2,0 l Toluol) werden. Die Bestimmung der Strahlungsintensität wurde in einem Packard-Liquid-Scintillation-Counter (Mod. 2450) durchgeführt.

2.2.6. Berechnung der Liganden Ca^{2+} und Mg^{2+} an Troponin

Die Berechnung der molaren Ca^{2+} und Mg^{2+} Bindungsraten erfolgten nach dem Programm MATRIX (2.1.6.) die Assoziationskonstanten wurden nach Jahnke und Heilmeyer (1980) verwendet.

3. ERGEBNISSE

3.1. Abtrennung der proteolytischen Aktivitäten vom Rohtroponin durch Aussalzchromatographie auf Caseinsepharose

Ein von uns früher entwickeltes Verfahren zur Entfernung von proteolytischen Aktivitäten in den Troponinpräparationen (Sperling,1977) erwies sich, wegen der nicht genau genug einzustellenden Bedingungen bei der Kopplung von Casein an der Sepharose, als schlecht reproduzierbar. Deshalb war es nötig ein neues Verfahren zu entwickeln: Dies gelang durch eine Aussalzchromatographie mit einem negativen Salzgradienten von Ammoniumsulfat in Gegenwart von 0,4 M LiCl. Die Abbildung 1 zeigt das Elutionsdiagramm einer solchen Chromatographie. Das Troponin wird in einen Ammoniumsulfatsättigungsbereich von 29 % bis 14 % eluiert. Das Troponin, das zwischen einem Ammoniumsulfatsättigungsbereich von 16 % bis 20 % eluiert wurde, war frei von jeglichen proteolytischen Aktivitäten. Die Fraktionen dieses Bereiches wurden gesammelt, vereinigt, eingeengt und sowohl zur weiteren Präparation von Dephosphotroponin, als auch für Phosphorylierungsexperimente verwendet.

3.2. Phosphatgehalt der Troponinkomplexe

Der Phosphatgehalt mehrerer Troponinpräparationen vor

und nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase ist in Tabelle 1 dargestellt. Das von Proteasen gereinigte Troponin enthielt im Durchschnitt etwas über 1 Mol Phosphat pro Mol Troponin (Molekulargewicht 90 200; Sperling et al., 1979), welches bis auf einen geringen Rest vollständig mit alkalischer Phosphatase entfernt werden konnte.

Tabelle 1

Phosphatgehalt mehrerer Troponinpräparationen in Mol Phosphat pro Mol Troponin

Probe Nr.:	unbehandelt	dephosphoryliert
1	1.15	0,1
2	0,98	0,05
3	1,07	0,05
4	0,95	0,05

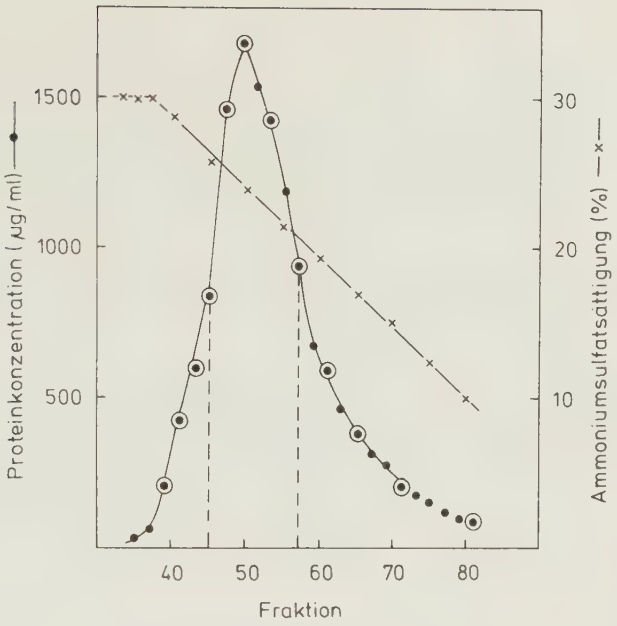

Abbildung 1: AUSSALZCHROMATOGRAPHIE VON TROPONIN AUF CASEINSEPHAROSE

45 ml Troponin (21 mg/ml) nach Ebashi (1971) wurden gegen 0,4 M LiCl; 30 % Ammoniumsulfatsättigung dialysiert und auf eine 5 x 25 cm Caseinsepharosesäule aufgetragen. Es wurde mit 500 ml der gleichen Lösung gewaschen, danach wurde mit einem 30 % nach 0 % Sättigung 4 l Ammoniumsulfatgradienten in 0,4 M LiCl eluiert. Die Laufgeschwindigkeit betrug 130 ml/min die Fraktionsgröße 25 ml. Die eingekreisten Fraktionen wurden einem Test auf proteolytische Aktivitäten unterzogen. Die Fraktionen 45 bis 57 wurden gesammelt, auf 20 ml eingeengt. Die Ausbeute betrug 325 mg. Der durch die gestrichelte Linie gekennzeichnete Bereich zwischen Fraktion 45 - 57 war frei von jeder proteolytischen Aktivität.

3.3. Kinetik des Phosphateinbaus in die TNI-Untereinheit mit katalytischer Einheit c-AMP-abhängiger Proteinkinase des Holotroponins und des Holodephosphotroponins

3.3.1. Mg^{2+}-Abhängigkeit der Phosphorylierung bei vorgegebener Ca^{2+}-Konzentration

In Abbildung 2 ist die Phosphateinbaugeschwindigkeit der TNI-Untereinheit des Gesamt-Troponinkomplexes mit katalytischer Einheit c-AMP-abhängiger Proteinkinase in einem Mg^{2+}-Konzentrationsbereich von 0 bis 15 mM bei Ca^{2+}-Konzentrationen von a) 6×10^{-8} M, b) 1×10^{-8} M, c) 6×10^{-9} M dargestellt.

Wie man sieht ist bei den niedrigen Ca^{2+}-Konzentrationen erstens die Aktivierbarkeit durch Mg^{2+} größer und zweitens verstärkt sich der Unterschied zwischen Holo- und Dephosphotroponin.

Die Darstellung der Phosphorylierungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von Mg^{2+} bei einer Ca^{2+}-Konzentration von 6×10^{-9} M nach Hill (1910) zeigt für das Holotroponin eine etwa 5-mal niedrigere Konzentration bei der halbmaximalen Geschwindigkeit $K_{0,5}$= 1,25 mM als für das Dephosphotroponin $K_{0,5}$= 5,8 (Abbildung 3a); auch zeigt der Hillkoeffizient von H = 1,9 für das Holotroponin im Gegensatz zum Dephosphotroponin H = 1,0 für das erstere ein kooperatives Aktivierungsverhalten von Mg^{2+}an.

Die Auftragung nach Lineweaver-Burke ergibt für das Dephosphotroponin eine $K_{0,5}$ = 5,2 mM Mg^{2+}. Die Maximalgeschwindigkeit ist für beide Troponinkomplexe gleich V_{max} = 4,1 nMole übertragenes Phosphat/mg Kinase x min (Abbildung 3b).

Als Kontrolle dafür, daß die Mg^{2+}-Abhängigkeit der Phosphorylierung in diesem Konzentrationsbereich kein Effekt an der katalytischen Einheit der c-AMP-abhängigen Proteinkinase ist, wurde die Phosphorylierung eines anderen Proteins, in diesem Fall Casein, Abhängigkeit von Mg^{2+} bestimmt (Abbildung 2c).

Abbildung 2: Mg^{2+}-ABHÄNGIGKEIT DER PHOSPHORYLIERUNG BEI VORGEGEBENER Ca^{2+}-KONZENTRATION

Je 450 µg Holotroponin -●- oder Dephosphotroponin -O- wurden bei 30° in einem 0,2 ml Ansatz mit 50 mM GP-HCl pH 6,9; 15 mM ME; 0 bis 15 mM Magnesiumacetat; 3 µg/ml katalytische Einheit c-AMP-abhängiger Proteinkinase; 0,35 mM ATP - γ - ^{32}P 10 - 20 Ci/Mol; 1 mM EGTA-Ca^{2+}-Puffer inkubiert.
a) 6 x 10^{-8} M Ca^{2+}; b) 1 x 10^{-8} M Ca^{2+};
c) 6 x 10^{-9} M Ca^{2+}. Nach 10 min, 20 min und 30 min wurden Proben zu 20 µl gezogen und daraus die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion bestimmt, die gegen die Mg^{2+}-Konzentration aufgetragen wurde. Die Einbaukinetik zeigte bei den höchsten Aktivitäten auch nach 60 min noch keine wesentliche Abweichung von der Linearität.
Bei der Kontrolle, ob die Mg^{2+}-Abhängigkeit des Phosphateinbaus nicht an der katalytischen Einheit der c-AMP-abhängigen Proteinkinase liegt, wurden 500 µg/ml Casein - x - in einem 0,1 ml Ansatz unter identischen Bedingungen wie 2 c) inkubiert. Die Werte der Ordinate sind dabei mit 10 zu multiplizieren.

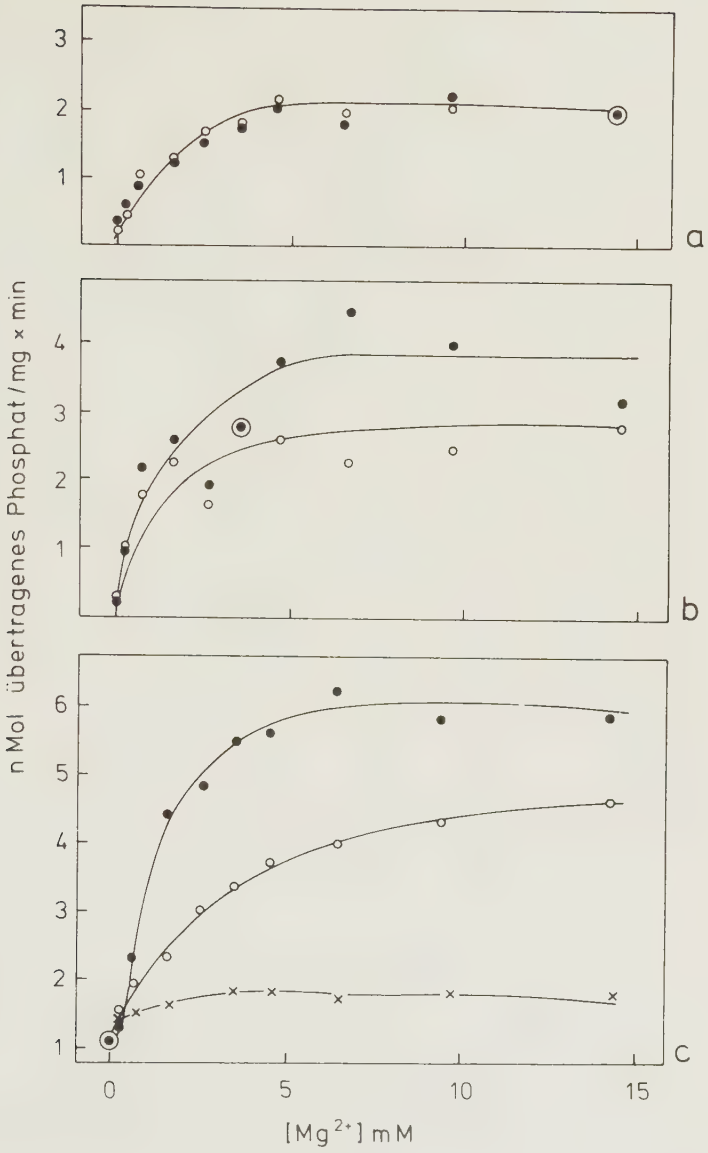

Abbildung 2

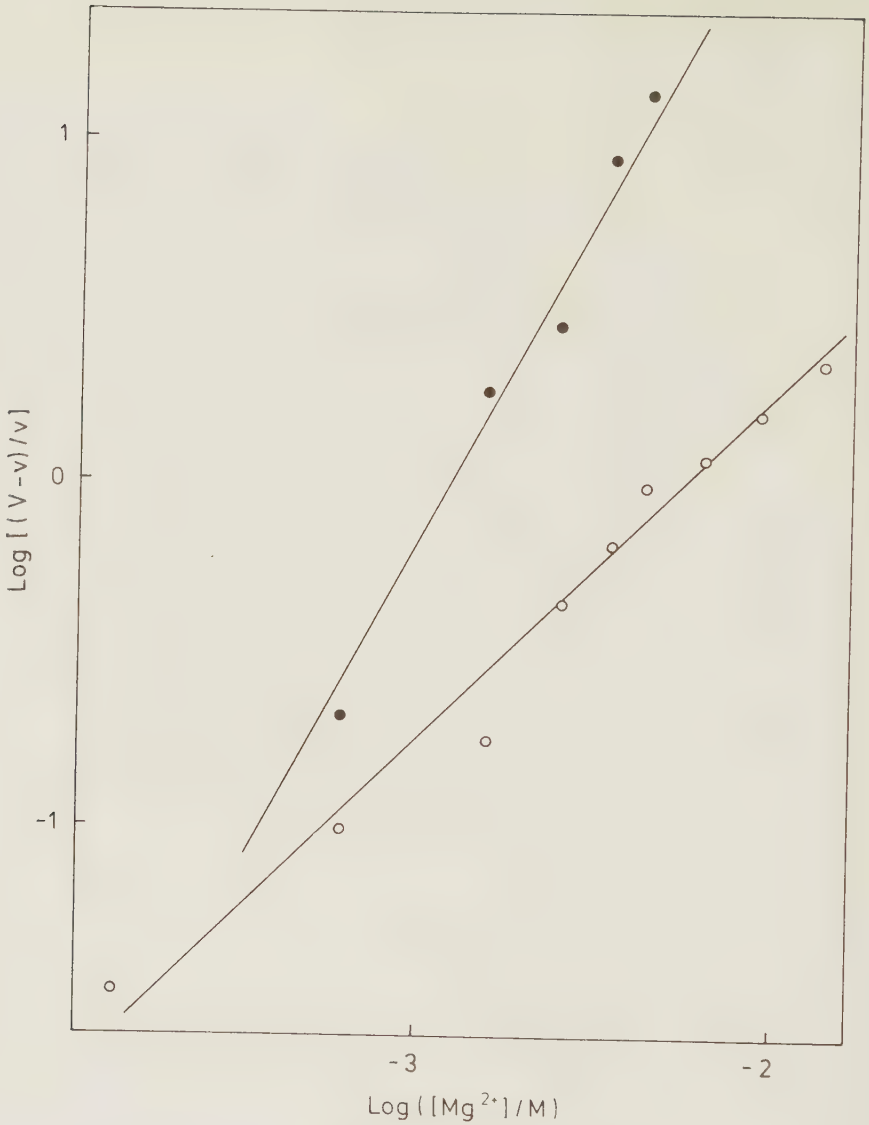

Abbildung 3a: DARSTELLUNG DER WERTE AUS ABBILDUNG 2c NACH HILL

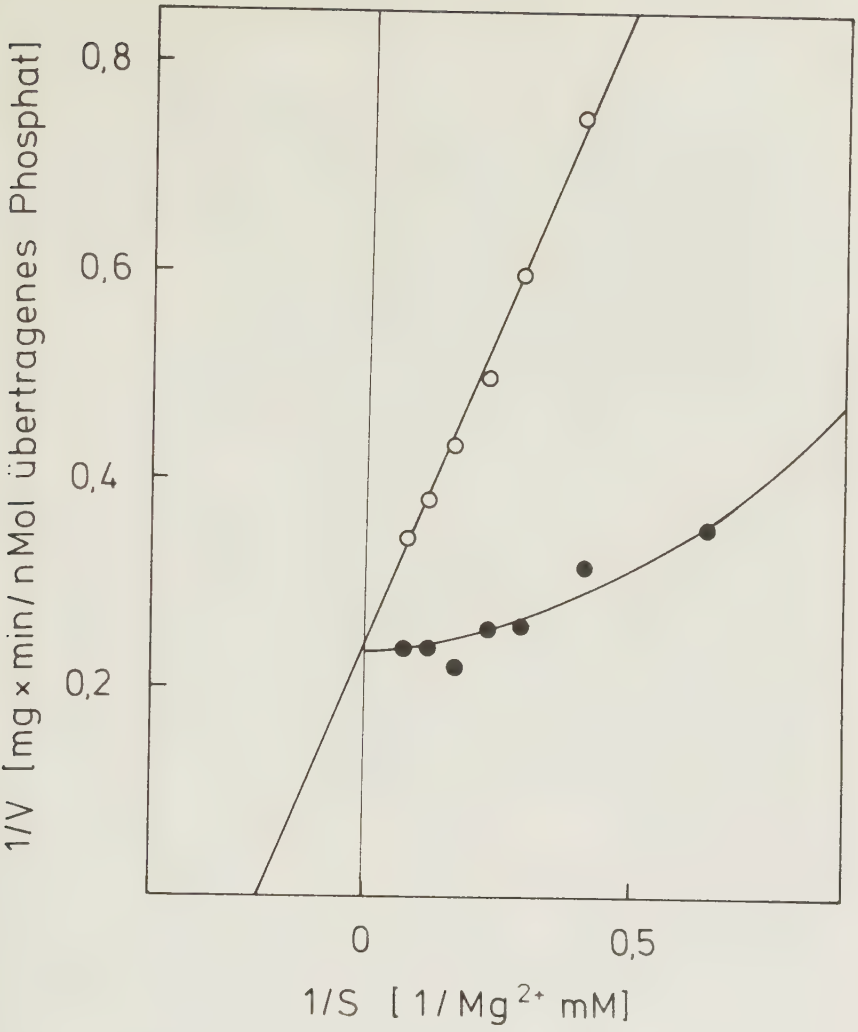

Abbildung 3b: DARSTELLUNG DER WERTE AUS ABBILDUNG 2c NACH LINEWEAVER UND BURKE

3.3.2. Ca^{2+}-Abhängigkeit der Phosphorylierung bei vorgegebener Mg^{2+}-Konzentration

In Abbildung 4 ist die Einbaugeschwindigkeit von Phosphat in die TNI-Untereinheit des Gesamt-Troponinkomplexes mit katalytischer Einheit c-AMP-abhängiger Proteinkinase in einem Ca^{2+}-Konzentrationsbereich von $2,5 \times 10^{-9}$ bis 1×10^{-5} M bei Mg^{2+}-Konzentrationen von a) 0 mM; b) 0,6 mM; c) 1,5 mM; d) 3,5 mM; e) 7,5 mM und f) 14,5 mM dargestellt.
Bei niedrigen Mg^{2+}-Konzentrationen besteht kein Unterschied zwischen Holo- und Dephosphotroponin, außerdem ist die maximale Aktivität bei Ca^{2+}-Entzug wesentlich geringer. Bei höheren Mg^{2+}-Konzentrationen ist das Holotroponin schon bei 3,5 mM durch Ca^{2+}-Entzug maximal enthemmbar, während dies beim Dephosphotroponin auch bei 14,5 mM Mg^{2+} noch nicht möglich ist. Dieser Befund stimmt mit dem unter 3.3.1. gefundenen gut überein.

Abbildung 4: Ca^{2+}-ABHÄNGIGKEIT DER PHOSPHORYLIERUNG BEI VORGEGEBENER Mg^{2+}-KONZENTRATION

Je 450 µg Holotroponin -●- oder Dephosphotroponin -O- wurden bei 30° in einem 0,2 ml Ansatz mit 50 mM GP-HCl pH 6,9; 15 mM ME; 1 mM EGTA-Ca^{2+}-Puffer 2,5 x 10^{-9} bis 1 x 10^{-5} M; 3 µg/ml katalytischer Einheit c-AMP-abhängiger Proteinkinase; 0,35 mM ATP - γ - ^{32}P 10 - 20 Ci/Mol mit folgenden freien Mg^{2+} -Konzentrationen, die nach 2.1.6. berechnet und mit Magnesiumacetat als Salz eingestellt wurden.

a) 0 mM; b) 0,6 mM; c) 1,5 mM; d) 3,5 mM; e) 7,5 mM; f) 14,5 mM.

Nach 10 min, 20 min und 30 min, wurden Proben zu 20 µl gezogen und daraus die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion bestimmt, die gegen den negativen Logarithmus der Ca^{2+}-Konzentration aufgetragen wurde. Die Einbaukinetik zeigte bei den höchsten Aktivitäten auch nach 60 min noch keine wesentliche Abweichung von der Linearität.

Abbildung 4a, b, c

Abbildung 4d, e, f

3.3.3. Aktivität der Phosphorylierung an der TNI-Einheit des Holotroponins in Abhängigkeit von den Besetzungszuständen der TNC-Einheit mit Ca^{2+} und Mg^{2+}

Von den unter 3.3.1. und 3.3.2. beschriebenen Versuchen wurde nach der unter 2.2.6. angegebenen Methode die jeweiligen Besetzungszustände von Ca^{2+} und Mg^{2+} berechnet und die Phosphorylierungsaktivität entweder gegen die gebundenen Ca^{2+} (Abbildung 5a; 6a; 7a) oder gegen die gebundenen Mg^{2+} (Abbildung 5b; 6b; 7b) aufgetragen.
Die Abbildungen 5a und 6a zeigen eine Aktivitätszunahme des Phosphateinbaus durch Verdrängung der Ca^{2+}-Liganden bei vorgegebener Ca^{2+}-Konzentration durch Zugabe von Mg^{2+}. Die Abbildungen 5b und 6b zeigen eine direkte Aktivitätszunahme durch Bindung von Mg^{2+}-Liganden bei Zugabe von Mg^{2+} und konstanter Ca^{2+}-Konzentration.
Bei der Abbildung 7 wurde die Mg^{2+}-Konzentration konstant gelassen und die Besetzung mit Mg^{2+} und Ca^{2+}-Liganden durch Variation der Ca^{2+}-Konzentration bestimmt.
Die Abbildung 7a zeigt eine Hemmung der Aktivität durch Bindung mit Ca^{2+}-Liganden. Bei der Abbildung 7b ist dagegen eine Steigerung der Aktivität durch die Bindung mit Mg^{2+}-Liganden zu sehen.
Was bei den Abbildungen 5 bis 7 sehr deutlich zu sehen ist, daß die Phosphorylierung durch die Bindung von Ca^{2+} beim Holotroponin schon bei wesentlich geringeren Be-

setzungszuständen gehemmt wird als beim Dephosphotroponin. Dagegen scheint für die Aktivierung mit Mg^{2+} eine höhere Besetzung beim Holotroponin als beim Dephosphotroponin nötig zu sein.

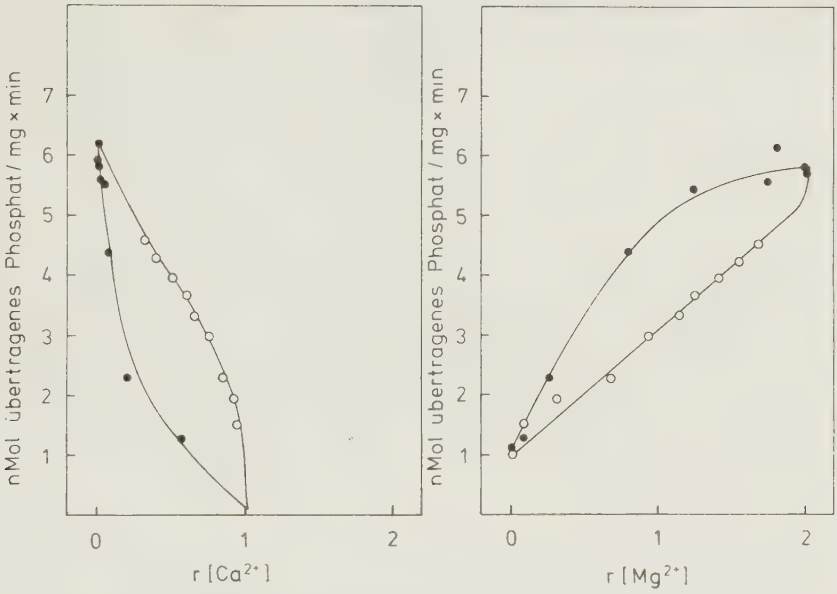

Abbildung 5: PHOSPHORYLIERUNGSAKTIVITÄT ALS FUNKTION DER BESETZUNGSZUSTÄNDE MIT Ca^{2+} (a) UND Mg^{2+} (b) BEI VARIABLER Mg^{2+}-KONZENTRATION

Die verwandten Werte entsprechen denen aus Abbildung 2c die Besetzungszustände wurden nach 2.2.6. berechnet. Holotroponin - ● -; Dephosphotroponin - O -.

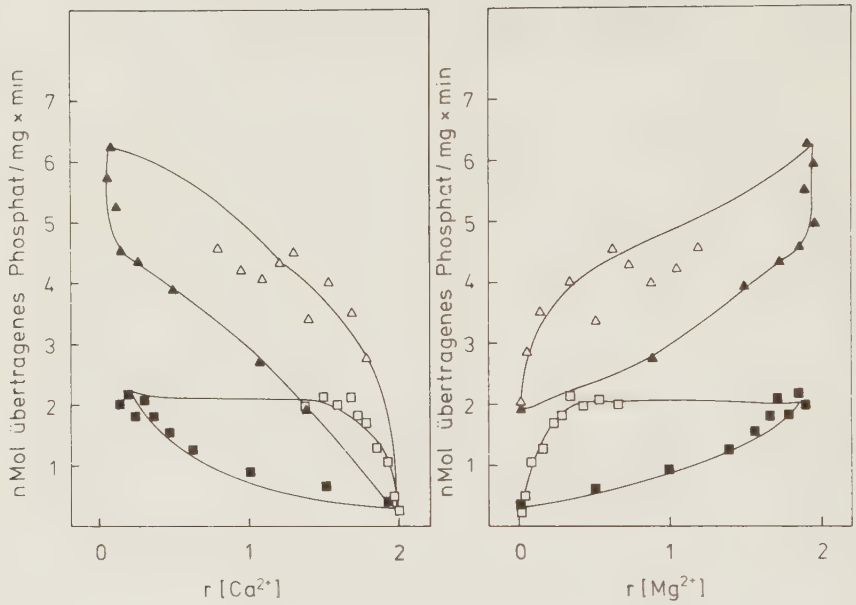

Abbildung 6: PHOSPHORYLIERUNGSAKTIVITÄT ALS FUNKTION DER BESETZUNGSZUSTÄNDE MIT Ca^{2+} (a) UND Mg^{2+} (b) BEI VARIABLER Mg^{2+}-KONZENTRATION

Die verwandten Werte entsprechen denen aus den Abbildungen 2a - ■, □ - und 2b - ▲, △ -. Die geschlossenen Symbole entsprechen Holotroponin, die offenen Dephosphotroponin. Die Besetzungszustände wurden nach 2.2.6. berechnet.

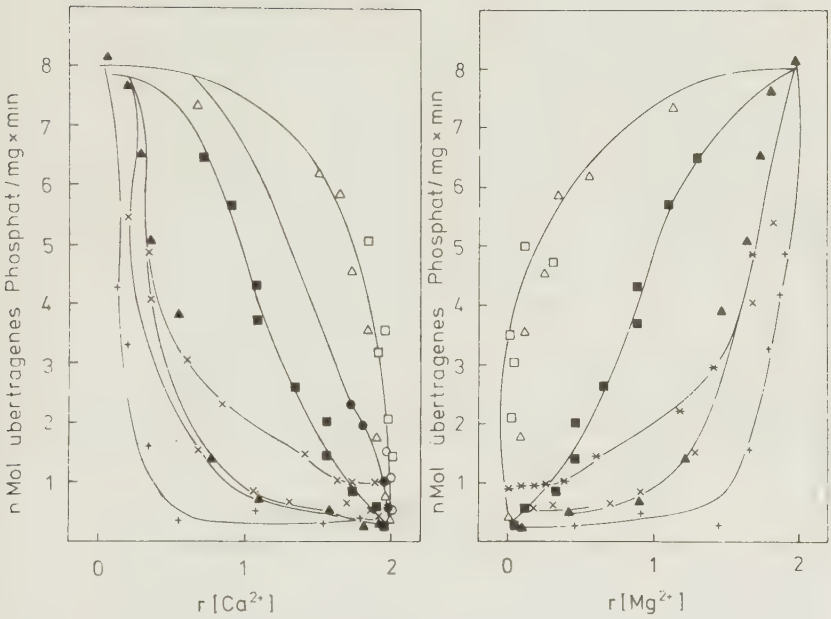

Abbildung 7: PHOSPHORYLIERUNGSAKTIVITÄT ALS FUNKTION DER BESETZUNGSZUSTÄNDE MIT Ca^{2+} (a) und Mg^{2+} (b) BEI VARIABLER Ca^{2+}-KONZENTRATION

Die verwandten Werte entsprechen denen aus den Abbildungen 4a - ●, ○ -; 4b - ■, □ -; 4c - * -; 4d - ▲, △ -; 4e - x -; 4f - + -. Die geschlossenen Symbole entsprechen Holotroponin, die offenen Dephosphotroponin. Die Besetzungszustände wurden nach 2.2.6. berechnet.

4. DISKUSSION

Zur Charakterisierung zweier verschiedener Troponinkomplexe mit unterschiedlichem Phosphatgehalt (Holotroponin und Dephosphotroponin) war es notwendig, den Phosphatgehalt des Ausgangsmaterials und dessen Bindungsstelle im Troponin genau zu definieren.

Von Perry und Cole (1973) wurden 1 Mol endogenes Phosphat pro Mol Troponin gefunden, welches an der TNT-Untereinheit des Troponins gebunden war. Mit alkalischer Phosphatase aus Escherichia Coli konnten diese Autoren das endogene Phosphat abspalten. Lallemant et al. (1975) übernahmen diese Methode der Dephosphorylierung, fanden aber keine Änderung der Ca^{2+}-abhängigen Inhibierung einer rekonstituierten Aktomyosin ATPase beim dephosphoryliertem Troponin. Nach unseren heutigen Kenntnissen (Sperling et al., 1979), müssen bei deren Versuchsansatz proteolytische Aktivitäten das Troponin an der TNT-Einheit angedaut haben, so daß die Kontrolle der Aktomyosin ATPase in ihrem Experiment auf den Troponinkomplex $(TNI)_2TNC$ (Sperling et al., 1979) zurückzuführen ist. Die TNT-Einheit, an der das endogene Phosphat vor der Dephosphorylierung gebunden war und deren Effekt nach der Entfernung des Phosphates auf die Aktomyosin-ATPase untersucht werden sollte, kann nach unserem Wissen gar nicht mehr in deren experimentellen System vorhanden ge-

wesen sein. Dies hat zur Folge, daß es sich durchaus lohnte, den Einfluss der Entfernung des Phosphates am TNT des Holotroponinkomplexes auf die Ca^{2+} bzw. Mg^{2+}-Sensitivität dieses Komplexes zu untersuchen.

Dies konnten wir tun, nachdem es uns in dieser Arbeit gelungen war eine gut reproduzierbare Methode (3.1.) zu entwickeln, um das Troponin von verunreinigenden Proteasen zu reinigen. So konnten wir das Troponin im präparativen Maßstab dephosphorylieren, ohne daß irgendwelche proteolytischen Abbaubanden auftraten. Unser Dephosphotroponin unterschied sich vom Holotroponin wirklich nur durch das Fehlen eines Phosphatrestes an der TNT-Untereinheit des Gesamt-Komplexes (vergl. Sperling et al.,1979 und Jahnke und Heilmeyer,1980).

Das in dieser Arbeit eingesetzte Holotroponin weist ebenfalls einen Phosphatgehalt von 1 Mol/90200 g Troponin auf, das am N-terminalen Serin-1 der TNT-Untereinheit gebunden ist (Pearlstone et al.,1977) und nach ^{31}P-NMR-Messungen (Sperling et al.,1979) als frei rotierbares Serin-Phosphat vorliegt. Dieses Phosphat konnte bis auf einen Rest von 0,05 bis 0,1 Mol/90 200 g Troponin (3.2.) entfernt werden.

Troponin besitzt an der TNC-Untereinheit 4 Mg^{2+}-Bindungsseiten (Potter und Gergely, 1975) von denen 2 auch alternativ von Ca^{2+} besetzt werden können. Da diese Bindungsseiten natürlich auch am TNC des an der TNT-Untereinheit dephosphorylierten Holotroponins vorhanden sind, schien uns ein Vergleich der Phosphorylierbarkeit an der TNI-Untereinheit mit der katalytischen Einheit von c-AMP-abhängiger Proteinkinase von Holo- und Dephosphotroponin bei definierten Ca^{2+} und Mg^{2+}-Konzentrationen sinnvoll.

Wie aus den Ergebnissen in 3.3.1. zu sehen ist, wird die Phosphorylierbarkeit des Troponins durch Mg^{2+} erhöht. Diese Aktivierung muß durch die Besetzung der Ca^{2+} kompetierbaren Bindungsseiten am TNC erfolgen was sich aus den dafür benötigten Mg^{2+}-Konzentrationen und den Bindungskonstanten ergibt (siehe Jahnke und Heilmeyer, 1980). Die Aktivierbarkeit durch Mg^{2+} wird allerdings durch eine Erhöhung der Ca^{2+}-Konzentration eingeschränkt (Abbildung 2a bis 2c). Die geringere Sensitivität auf die Mg^{2+}-Aktivierung beim dephosphorylierten Troponin wird um so deutlicher, je weniger die durch Mg^{2+} induzierte Aktivierung durch Ca^{2+} limitiert wird (Abbildung 2b, 2c, 3a, 3b).
Diese Aktivierung durch Mg^{2+} kann man nicht auf einen Effekt an der katalytischen Untereinheit der c-AMP-abhängigen Proteinkinase zurückführen. Denn dann ließe sich erstens nicht erklären warum die Sensitivität der

Aktivierung auf Mg^{2+} beim Holotroponin wesentlich größer ist als beim Dephosphotroponin und zweitens müßte man eine entsprechende Aktivierung der Phosphorylierung mit der katalytischen Einheit der c-AMP-abhängigen Proteinkinase durch Mg^{2+} auch an einem anderen Protein, zum Beispiel, Casein, finden. Dies ist aber, wie in Abbildung 2c zu sehen ist, nicht der Fall.

Anders als Jahnke und Heilmeyer (1980), die bei ihren direkten Bindungsmessungen eine 30-fach höhere Affinität für die Ca^{2+}-kompetierbaren Mg^{2+}-Bindungsseiten am Holotroponin als am Dephosphotroponin finden, zeigen unsere kinetischen Messungen eine 5-fach höhere Affinität. Dieser Unterschied stellt keinen Widerspruch dar, da zwischen der Bindung von Mg^{2+} an der TNC-Untereinheit und der Phosphorylierung an der TNI-Untereinheit sicherlich noch einige, uns nicht bekannte, Mechanismen von Konformationsänderungen liegen.
Bei der Bestimmung der Kooperativität für die Aktivierung durch Mg^{2+} stimmen unsere Werte mit denen, von obigen Autoren für die Bindung von Mg^{2+} an den Ca^{2+}-kompetierbaren Mg^{2+}-Bindungsseiten gefundenen Kooperativitäten für Holo- und Dephosphotroponin überein (3.3.1.).

Die für beide Komplexe gefundene gleiche Maximalgeschwindigkeit des Phosphateinbaus (Abbildung 3b) zeigt, daß bei maximaler Aktivierung der Phosphorylierung in die TNI-

Untereinheit des Gesamt-Komplexes diese nicht mehr durch das TNC begrenzt wird, da sich,wie wir schon früher gezeigt haben (Sperling, 1977),die TNI-Untereinheit des Gesamt-Komplexes so verhält, wie das nicht im Verband gebundene freie TNI. Die Hemmung der Phosphorylierbarkeit des TNI durch das TNC wird also durch Zugabe von Mg^{2+} und gleichzeitigem Entzug von Ca^{2+} aufgehoben.

Bei der Variation der Ca^{2+}-Konzentration bei festgelegter Mg^{2+}-Konzentration ergibt sich für die Phosphorylierbarkeit des TNI's ein ähnliches Bild (3.3.2.).

So zeigt sich, daß trotz sehr geringer Ca^{2+}-Konzentration (unter 10^{-8}M) ohne Mg^{2+} keine nennenswerte Aktivierung des Phosphateinbaus in die TNI-Einheit des Holotroponins als auch des Dephosphotroponins möglich ist (Abbildung 4a). Bei einer geringen Konzentration freien Mg^{2+} (Abbildung 4b) ergibt sich schon eine deutliche Aktivierung des Phosphateinbaus bei Ca^{2+}-Entzug in beide Troponinkomplexe; allerdings zeigt sich dabei noch kein Unterschied zwischen Holo- und Dephosphotroponin. Bei höheren Mg^{2+}-Konzentrationen (Abbildung 4c bis 4f) ist die Aktivierbarkeit der Phosphorylierung durch Ca^{2+}-Entzug schon deutlich.

Die bessere Zugänglichkeit zur Phosphorylierung der TNI-

Untereinheit im Holotroponinkomplex bei den tieferen Ca^{2+}-Konzentrationen in den Abbildungen 4c bis 4f, ist nicht auf den Entzug von Ca^{2+} sondern vielmehr auf eine bei diesen tiefen Ca^{2+}-Konzentrationen möglich gewordene Bindung von Mg^{2+} an den Ca^{2+}/Mg^{2+}-kompetitiven Bindungsstellen des TNC's zurückzuführen.
Dies ergibt sich durch Vergleich mit den Abbildungen 2a und 2c, in denen sich erst bei geringerer Konzentration von Ca^{2+} eine Aktivierung mit Mg^{2+} möglich war. Dies ist beim Holotroponin (bei 6 x 10^{-9} M Ca^{2+}) schon bei einer Mg^{2+}-Konzentration von 1,5 mM, was der Abbildung 4c entspricht, schon zu 80 % der maximal möglichen der Fall (siehe Abbildung 2c). Beim Dephosphotroponin ist dies erst bei einer Mg^{2+}-Konzentration von 14,5 mM entsprechend der Abbildung 4f der Fall.

Um unsere Werte mit den Bindungsdaten von Jahnke und Heilmeyer (1980) vergleichen zu können, haben wir für alle unsere Versuche den jeweiligen Besetzungszustand mit Ca^{2+} und Mg^{2+} am TNC des Gesamt-Komplexes berechnet (2.2.6.) und mit der jeweiligen Aktivierung der Phosphorylierbarkeit verglichen (Abbildungen 5 bis 7). Dabei zeigte sich, daß es nicht möglich war für alle Ca^{2+} und Mg^{2+}-Besetzungszustände ein Modell für die Phosphorylierbarkeit der TNI-Einheit aufzustellen. Die in den Abbildungen 6 und 7 dargestellte maximale Hemmung bei der Bindung von 2 Ca^{2+} und maximalen Zugänglichkeit für die Phos-

phorylierung bei der Bindung von 2 Mg^{2+} ist darauf zurückzuführen, daß bei diesen Experimenten Ca^{2+} oder Mg^{2+}-Konzentrationen herrschten, bei denen die Ca^{2+}/Mg^{2+}-kompetitiven Bindungsseiten stets voll sind. Es kommt dabei auf das Verhältnis der Konzentrationen von Ca^{2+} zu Mg^{2+} an mit welchen Ionen die Bindungsseiten der TNC-Untereinheit besetzt sind. Daß dabei kein linearerer Zusammenhang zwischen Besetzungszustand und Phosphorylierbarkeit besteht, liegt daran, daß die Besetzung mit Mg^{2+} nicht lediglich eine Aufhebung der Hemmwirkung von Ca^{2+} bewirkt, sondern zusätzlich einen Effekt auf die Phosphorylierbarkeit besitzt. Dies läßt sich durch die Abbildung 5a, b, beweisen.

Bei diesem Experiment wurde eine so niedrige Ca^{2+}-Konzentration (6×10^{-9} M) gewählt, daß die 2 Ca^{2+}/Mg^{2+}-kompetiven Bindungsseiten auch ohne Kompetition durch Mg^{2+} höchstens mit 0,6 Mol Ca^{2+} für Holotroponin bzw. 0,95 Mol Ca^{2+} für Dephosphotroponin besetzt sind (Abbildung 5a). Wäre die Wirkung des Mg^{2+} lediglich eine Verdrängung des Ca^{2+}, so ständen unter diesen Bedingungen 70 % des Holotroponins bzw. über 50 % des Dephosphotroponins zur Phosphorylierung zur Verfügung. Tatsächlich werden aber nur 20 % der maximalen Phosphorylierungsgeschwindigkeit erreicht. Bei Zugabe von Mg^{2+} werden freie Ca^{2+}/Mg^{2+}-Bindungsstellen besetzt und Ca^{2+} aus seinen Bindungsstellen verdrängt. So läßt sich auch der überpro-

portional hohe Anstieg der maximalen Phosphorylierbarkeit bei Ca^{2+}-Entzug und auch die scheinbare maximale Hemmung bei der Besetzung mit nur 1 Mol Ca^{2+} in Abbildung 5a erklären, da hier lediglich die Verdrängung von Ca^{2+} dargestellt wird.
Bestimmend ist aber für die maximale Phosphorylierung die Besetzung von unter diesen experimentellen Bedingungen freien Ca^{2+}/Mg^{2+}-Bindungsstellen mit Mg^{2+}, wie in Abbildung 5b zu sehen ist, ergibt sich für die Bindung von Mg^{2+} dabei ein linearer Zusammenhang (besonders für Dephosphotroponin) mit einer maximalen Phosphorylierbarkeit bei der Bindung von 2 Mol Mg^{2+}.

Der in Abbildung 7 so auffällige Unterschied zwischen Ca^{2+} bzw. Mg^{2+}-Bindung und Phosphorylierbarkeit (die Werte für die Phosphorylierbarkeit stammen aus Abbildung 4), liegt an den unterschiedlichen Assoziationskonstanten von Holo- und Dephosphotroponin für Ca^{2+} und Mg^{2+}, die von Jahnke und Heilmeyer, 1980, bestimmt wurden.

Für die intramolekulare Wechselwirkung im Troponin ergibt sich folgendes Bild.
Durch das Phosphat im TNT des Holotroponins steigt die Affinität Ca^{2+}-kompetierbaren Mg^{2+}-Bindungsseiten für Mg^{2+} auf das 5-fache und wird zudem kooperativ (Hill-Konstante H = 1,9). Für das Dephosphotroponin folgt da-

raus eine Erniedrigung der aktuellen Ca^{2+}-Affinität. Das läßt vermuten, daß das Phosphat am Serin-1 des TNT einen starken Einfluß auf die Tertiärstruktur der Ca^{2+}-Bindungsdomänen III und IV ausüben muß, an der das TNT bindet (Leavis et al., 1978), weil das frei bewegliche Phosphat (Sperling et al., 1979) keine zusätzliche Wechselwirkung mehr an diesen Domänen eingehen kann.

Als möglichen Mechanismus kann man ein Eingreifen des dephosphorylierten N-terminalen Teils des TNT in die Bindungsregion des TNC diskutieren. Durch eine Phosphatgruppe am endständigen Serin würde diese Wechselwirkung aufgehoben und die Mg^{2+}-Affinität dieser Region erhöht.

Da die freie Mg^{2+}-Konzentration im Muskel bei etwa 0,6 mM liegt (Gupta und Moore, 1980), bedeutet dies, daß die Ca^{2+}-kompetitierbaren Mg^{2+}-Bindungsseiten im Dephosphotroponin entweder frei oder mit Ca^{2+} besetzt sind, während sie im Fall des am TNT phosphorylierten Troponins im ruhenden Muskel mit Mg^{2+} besetzt sind und erst nach Ca^{2+}-Ausschüttung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum mit Ca^{2+} besetzt werden. Bedenkt man, daß die freie Ca^{2+}-Konzentration in der Muskelzelle unter 10^{-8} M sinken kann, einen für das Volumen eines Sarkomers schon statistischen Bereich, bedeutet dies, daß in diesem Fall das Dephosphotroponin ohne gebundenes Metallion vorliegt,

das TNC also zum Teil als ungeordnetes Knäuel vorliegt (Tsalkowa und Privalov, 1980), während die Struktur beim nicht dephosphorylierten Troponin durch Mg^{2+} stabil gehalten wird. Dies könnte zu einer schnelleren Ca^{2+}-Aufnahme der TNC-Einheit des Holotroponins bei Ca^{2+}-Ausschüttung durch das sarkoplasmatische Retikulum und damit zu einer schnelleren Kontraktion führen, während das dephosphorylierte Troponin nur langsam auf Ca^{2+} reagieren würde.

Im Gegensatz zu Ca^{2+}, dessen Konzentration bei der Kontraktion in der Muskelzelle um das tausendfache ansteigt (Ebashi, 1960; Ebashi, 1961), bleibt die Konzentration des Mg^{2+} gleich (Gupta und Moore, 1980). Die Informationsübertragung geschieht vielmehr durch Änderung der Mg^{2+}-Assoziationskonstanten am Troponin. Das heißt, wir haben es hier mit einem biologischen Modell zu tun, bei der die Signalübertragung durch Einschalten, hier Phosphat am TNT, oder Ausschalten, hier kein Phosphat am TNT, am Empfänger gesteuert wird.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1.) Es wurde eine gut reproduzierbare Methode entwickelt, um die Troponinpräparationen aus Kaninchenskelettmuskulatur von kontaminierenden proteolytischen Aktivitäten zu reinigen.

2.) Es wurden Holotroponinkomplexe mit definiertem Phosphatgehalt am Serin-1 der TNT-Einheit hergestellt.

3.) Es wurde die Phosphorylierbarkeit der verschiedenen Holotroponinkomplexe an der TNI-Einheit bei definierten Ca^{2+}- und Mg^{2+}-Konzentrationen bestimmt.

4.) Aus den erhaltenen Daten wurde ein Modell für die biologische Bedeutung des Serin-1-Phosphats bei der Bindung von Mg^{2+} und Ca^{2+} an TNC und dessen Bedeutung für die Phosphorylierbarkeit des TNI's erstellt: Die Phosphorylierbarkeit wird durch Ca^{2+} gehemmt und durch Mg^{2+} gesteigert. Die Steigerung durch Mg^{2+} kann aber nur wirksam werden, wenn kein Ca^{2+} am TNC gebunden ist. Die Ansprechbarkeit auf die Erhöhung der Phosphorylierbarkeit des TNI's durch Bindung von Mg^{2+} an das TNC wird durch den Ausbau des Serin-1-Phosphates aus dem TNT stark erniedrigt.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Bailey, C. und Villar-Palasi, C. (1971)

Fed. Proc. 30, 1147

Bartlett, G.R. (1959)

J. Biol. Chem. 234, 466-468

Beavo, J.A., Bechtel, P.J. und Krebs, E.G. (1974)

Methods Enzymol. 38, 299-308

Collins, J.H., Greaser, M.L., Potter, J.D. und Horn, M.J. (1977)

J. Biol. Chem. 252, 6356-6362

Ebashi, S. (1960)

J. Biochem. (Tokyo) 48, 150

Ebashi, S. (1961)

Supp. Prog. Theor. Phys. 17, 37

Ebashi, S., Kodama, A. und Ebashi, F. (1968)

J. Biochem. (Tokyo) 64, 465

Ebashi, S., Wakabayashi, T. und Ebashi, F. (1971)

J. Biochem. (Tokyo) 69, 441-445

Elzinga, M., Collins, J.H., Kuehl, W.M. und Adelstein, R.S. (1973)

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 2687

Glynn, I.M. und Chappel, J.B. (1964)

Biochem. J. 90, 147-149

Greaser, M.L. und Gergely, J. (1971)

J. Biol. Chem. 246, 4226-4233

Gupta, R.K. und Moore, R.D. (1980)

J. Biol. Chem. 255, 987

Hanson, J. und Lowy, J. (1963)

J. Mol. Biol. 6, 46

Hartshorne, D.J. und Pyun, H.Y. (1971)

Biochim. Biophys. Acta 229, 698

Hill, A.V. (1910)

J. Physiol. 90, 4-7

Huxley, H.E. (1957)

Biophys. Biochem. Cytol. 3, 631

Huxley, H.E. (1972)

The Structure and Funktion of Muscle, Volume I,

Structure Part 1, Bourne, G.H. ed.,

Academic Press, New York and London

Jahnke, U. und Heilmeyer, L.M.G., jr. (1980)

Eur. J. Biochem. 111, 325-332

Lallemant, C., Seraydarian, K., Mommaerts, W.F.H.M. und Suh, M. (1975)

Arch. Biochem. Biophys. 169, 367-371

Leavis, P.C., Rosenfeld, S.S., Gergely, J., Grabarek, Z. und

Drabikowski, W. (1978)

J. Biol. Chem. 253, 5452-5459

Lowey, S., Slater, H.S., Weeds, A.G. und Baker, H. (1969)

J. Mol. Biol. 42, 1

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951)

J. Biol. Chem. 193, 263-275

McCubbin, W.D., Mani, R.S. und Kay, C.M. (1974)

Biochemistry 13, 2689

Pearlstone, J.R., Johnson, P., Carpenter, M.R. und Smillie, L.B. (1977)

J. Biol. Chem. 252, 983-989

Perrin, D.D. und Sayce, I.G. (1967)

Talanta 14, 833-842

Perry, S.V., Cole, H.A., Head, J.F. und Trayer, J.P. (1972)

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 251

Perry, S.V. und Cole, H.A. (1973)

Biochem. J. 131, 425-428

Potterm J.D. und Gergely, J. (1975)

J. Biol. Chem. 250, 4628-4633

Schaub, M.L. und Perry, S.V. (1969)

Biochem. J. 115, 993

Sillen, L.G. und Martell, A.E. (1971)

Stability Constants of Metal Ion Complexes,

Supplement No. 1, Special Publication No. 25,

The Chemical Society, London

Sperling, J.E. (1977)

Dissertation, Ruhr-Universität Bochum

Sperling, J.E., Jahnke, U. und Heilmeyer, L.M.G., jr. (1978)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 1153

Sperling, J.E., Feldmann, K., Meyer, H., Jahnke, U. und
Heilmeyer, L.M.G., jr. (1979)
Eur. J. Biochem. 101, 581-592

Sperling, J.E., Jahnke, U. und Heilmeyer, L.M.G., jr. (1980)
Journal of Muscle Research and Cell Motility, 1

Sperling, J.E. und Heilmeyer, L.M.G., jr. (1980)
Journal of Muscle Research and Cell Motility, 1

Szent-Györgyi, A.G. (1951)
in The Chemistry of Muscular Contraction,
Acad. Press S. 146, New York

Szent- Györgyi, A.G., Mazia, D. und Szent-Györgyi, A. (1955)
Biochim. Biophys. Acta 16, 339

Tsalkowa, T.N. und Privalov, P.L. (1980)
Biochem. Biophys. Acta 624, 196

Weber, K. und Osborn, M. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 4406-4412

Wilkinson, J.M. und Grand, R.J.A. (1975)
Biochem. J. 149, 493-496

```
C MATRIX
      PROGRAM MATRIX(TAPE1,TAPE2,TAPE3,TAPE4)
      DIMENSION C(200),Y1(10),Y2(10),Y3(10),Y4(10),BTOT(10),
     1CLTOT(10),TX(10),VX(10),ML(10,200),MM(10,200),MN(200),
     1AL(10,200),AM(10,200),AN(200),B(200),E(200),DM(10),DMY(10),
     3KOSPNR(200)
      CHARACTER*60 TEXT
      COMMON C,Y1,Y2,Y3,Y4,BTOT,CLTOT,TX,VX,ML,MM,MN,AL,AM,AN,NL,NM,
     1N,B,UX,IPT
    2 FORMAT(21I2,8X,F8.4)
    6 FORMAT(   I3,2X,21(1X,I2),3X,F8.4)
    8 FORMAT(10F8.4)
    9 FORMAT(1X,' TOTAL CONCN. OF METAL(',I2,4H) = ,E10.3)
   10 FORMAT(1X,25H TOTAL CONCN. OF LIGAND (,I2,4H) = ,E10.3)
   11 FORMAT(///13X,2HC1,9X,2HC2,9X,2HC3,9X,2HC4,9X,2HC5,9X,2HC6,9X,
     12HC7,9X,2HC8,9X,2HC9,8X,3HC10)
   12 FORMAT(2I2,I3)
   63 FORMAT(1X,120('*'))
   17 FORMAT(F10.4,I1)
   30 FORMAT(/1X,'PH = ',F6.3)
   33 FORMAT(///6X,'L1 L2 L3 L4 L5 L6 L7 L8 L9 L0 M1 M2 M3 M4 M5 M6',1X,
     1'M7 M8 M9 M0 PH   LOG.BETA',1X/)
   34 FORMAT(' FREE METALS ')
   35 FORMAT(8X,10(1X,E10.3))
   36 FORMAT(' FREE LIGANDS ')
   37 FORMAT(' COMPLEX SPECIES ')
   43 FORMAT(1X, I3,1H-,I3,10(1X,E10.3))
 1001 FORMAT(' NUMBER OF CALCULATIONS ')
 1004 FORMAT(' CONC. OF L1,L2,....')
 1006 FORMAT(' CONC. OF M1,M2,....')
 1005 FORMAT(' PH, 0 IF NEXT PH FOLLOWS, 1 FOR NEXT CONC.DATA')
      WRITE(2,1001)
      READ*,NJ
      READ(4,*)TEXT
      WRITE(2,*)TEXT
      WRITE(3,*)TEXT
      NJD=0
      READ(4,*)NL,NM,N
      WRITE(2,33)
      WRITE(3,33)
      DO 7 J=1,N
    3 READ(4,*)(ML(I,J),I=1,NL),(MM(I,J),I=1,NM),MN(J),E(J)
      WRITE(3,6)J,(ML(I,J),I=1,10),(MM(I,J),I=1,10),MN(J),E(J)
    7 WRITE(2,6)J,(ML(I,J),I=1,10),(MM(I,J),I=1,10),MN(J),E(J)
  106 WRITE(2,1004)
      READ*,(CLTOT(I),I=1,NL)
      WRITE(2,1006)
      READ*,(BTOT(I),I=1,NM)
      WRITE(2,63)
      WRITE(2,10)( I,CLTOT(I),I=1,NL)
      WRITE(3,63)
      WRITE(3,10)(I,CLTOT(I),I=1,NL)
      DO 1000 I=1,NM
      WRITE(2,9)I,BTOT(I)
 1000 WRITE(3,9)I,BTOT(I)
      HX=ALOG(10.0)
      IPT=1
      DO 4 J=1,N
      AN(J)=MN(J)
      DO 4 I=1,10
      AL(I,J)=ML(I,J)
    4 AM(I,J)=MM(I,J)
      DO 13 I=1,N
   13 B(I)=EXP(HX*E(I))
      DO 14 I=1,NM
   14 Y1(I)=BTOT(I)*0.0003
      DO 15 I=1,NL
   15 Y3(I)=CLTOT(I)*0.0003
   16 WRITE(2,1005)
      READ*,PH,INDEX
```

```
      WRITE(2,30)PH
      WRITE(3,30)PH
      UX=EXP(HX*PH)
      IF(IPT-1)18,18,27
   18 DO 19 I=1,NM
   19 VX(I)=BTOT(I)
      DO 20 I=1 ,NL
      DMY(I)=1.0
      DO 22 J=1,N
      IF(ML(I,J))22,22,200
  200 DO 21 K=1,NM
      IF(MM(K,J))22,21,22
   21 CONTINUE
      DM(I)=(EXP(HX*E(J)))*UX**MN(J)
      DMY(I)=DMY(I)+DM(I)
   22 CONTINUE
   20 CONTINUE
      DO 23 I=1,NL
   23 TX(I)=CLTOT(I)/DMY(I)
   27 CALL COGS
      WRITE(2,11)
      WRITE(2,34)
      WRITE(2,35)(VX(I),I=1,NM)
      WRITE(2,36)
      WRITE(2,35)(TX(I),I=1,NL)
      WRITE(2,37)
      WRITE(3,11)
      WRITE(3,34)
      WRITE(3,35)(VX(I),I=1,NM)
      WRITE(3,36)
      WRITE(3,35)(TX(I),I=1,NL)
      WRITE(3,37)
      KP=0
   40 KP=KP+1
      KN=10*KP
      KM=KN-9
      IF(KN-N)41,42,42
   41 WRITE(2,43)KM,KN,(C(I),I=KM,KN)
      WRITE(3,43)KM,KN,(C(I),I=KM,KN)
      GOTO 40
   42 WRITE(2,43)KM,N,(C(I),I=KM,N)
      WRITE(3,43)KM,N,(C(I),I=KM,N)
      IF(INDEX)31,16,31
   31 NJD=NJD+1
      IF(NJD-NJ)106,32,32
   32 STOP 'ENDE DER DURCHSAGE !**********'
      END
      SUBROUTINE COGS
      DIMENSION TERM(200),TERN(200),C(200),Y1(10),Y2(10),Y3(10),
     1Y4(10),BTOT(10),CLTOT(10),TX(10),VX(10),ALO(10),BO(10),TY(10),
     2VY(10),ML(10,200),MM(10,200),MN(200),AL(10,200),AM(10,200),
     3AN(200),B(200)
      COMMON C,Y1,Y2,Y3,Y4,BTOT,CLTOT,TX,VX,ML,MM,MN,AL,
     1AM,AN,NL,NM,N,B,UX,IPT
   99 FORMAT(' NUMBER OF ITERATIONS = ',I4)
  998 FORMAT(' ITERATION DID NOT CONVERGE ')
      NIT=0
      DO 1 K=1,N
    1 TERM(K)=B(K)*UX**MN(K)
    2 DO 3 K=1,N
    3 TERN(K)=TERM(K)
      DO 4 K=1,N
      DO 4 J=1,NM
    4 TERN(K)=TERN(K)*VX(J)**MM(J,K)
      DO 5 K=1,N
      DO 15 J=1,NL
   15 TERN(K)=TERN(K)*TX(J)**ML(J,K)
    5 C(K)=TERN(K)
      NIT=NIT+1
      DO 7 I=1,NM
```

LEBENSLAUF

10.05.1950	Geburt als zweites Kind des Kaufmannes Chaim Sperling und seiner Ehefrau Cyma in München
Juli 1954	Übersiedlung meiner Familie nach New York
April 1955	Rückkehr nach München
September 1956	Einschulung in die Central-Schule in Neu-Ulm
April 1961	Aufnahme in das Kepler-Gymnasium in Ulm
November 1962	Wechsel auf die Alfred-Krupp-Schule in Essen
Juni 1969	Reifeprüfung
Oktober 1969	Beginn des Chemiestudiums an der Ruhr-Universität Bochum
15.10.1974	Beginn des Medizinstudiums
November 1974	Abschluß meiner Diplomarbeit am Institut für Analytische Chemie der Ruhr-Universität Bochum
11.08.1976	Eheschließung mit Chana Friedmann in Tel-Aviv
August 1977	Medizinische Vorprüfung
17.02.1978	Promotion zum Dr. rer. nat. in der Abteilung für Chemie der Ruhr-Universität Bochum
16.01.1980	Geburt meines Sohnes Alexander
15.10.1981	Medizinisches Staatsexamen
2.11.1981	Approbation als Arzt
seit 2.11.1981	Assistenzarzt der Abteilung für Anästhesie am Elisabeth-Hospital in Bochum